(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 388 255**

(21) Número de solicitud: 201130356

(51) Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **15.03.2011**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **11.10.2012**

(71) Solicitante/s:
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es:
GARCÍA CAYUELA, TOMÁS;
MOHEDANO BONILLO, M LUZ;
PÉREZ GÓMEZ DE CADIÑANOS, M LUZ;
FERNÁNDEZ DE PALENCIA DELGADO, PILAR;
BODEN, DANIEL;
WELLS, JERRY;
PELÁEZ MARTÍNEZ, CARMEN;
LÓPEZ GARCÍA, PALOMA y
REQUENA ROLANIA , TERESA

(74) Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

(54) Título: **VECTORES DE FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL PARA REGIONES PROMOTORAS UNI- Y BIDIRECCIONALES PARA SU USO EN BACTERIAS LÁCTICAS.**

(57) Resumen:
Vectores de fusión transcripcional para regiones promotoras uni- y bidireccionales para su uso en bacterias lácticas.
La presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica recombinante que comprende la secuencia del gen mrfp que codifica para una proteína autofluorescente roja optimizada para la expresión en bacterias lácticas así como a los vectores que la comprenden. La invención también se refiere a las células que comprenden la secuencia o el vector de la invención y sus usos. Así mismo, también se refiere al uso tanto de la secuencia como del vector para la detección y caracterización de una región promotora unidireccional o bidireccional, así como de su uso para transcripción. Además, se refiere al uso de las células que contienen la secuencia de la invención o el vector de la invención para la determinación de la capacidad colonizadora de células. También se refiere a los métodos relacionados con los usos de la invención, a un kit que comprende los elementos de la invención y su uso.

ES 2 388 255 A1

DESCRIPCIÓN

Vectores de fusión transcripcional para regiones promotoras uni- y bidireccionales para su uso en bacterias lácticas.

La presente invención se refiere a nuevos vectores de fusión transcripcional que contienen el gen *mrfp,* que codifica para una proteína fluorescente roja, optimizado en codones para su expresión en bacterias lácticas. Dichos vectores son útiles para la clonación, detección y caracterización de regiones promotoras unidireccionales o bidireccionales. Además, también son útiles para la detección de la expresión de polinucleótidos de interés y para la determinación de la capacidad colonizadora de las células que los comprenden.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los genes que codifican proteínas fluorescentes mediante formación autocatalítica del fluoróforo son ideales para ser empleados como marcadores en la evaluación de expresión génica y para un amplio rango de procedimientos de biología molecular. Existe una amplia oferta comercial de vectores disponibles para realizar ensayos de expresión génica que incorporan como marcador la expresión de la proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein", GFP) procedente de *Aequorea victoria*. Otros marcadores ampliamente difundidos son los genes que codifican para β-galactosidasa (β-gal), luciferasa, cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), fosfatasa alcalina secretada (SEAP), entre otras. El gen que codifica la GFP se ha utilizado como marcador de procesos biológicos como actividad y regulación génica, de plegamiento y localización celular de proteínas y seguimiento *in vitro* e *in vivo* de células marcadas (Wiedenmann, Oswald y Nienhaus (2009) IUBMB Life 61: 1029-1042).

Entre las proteínas autofluorescentes que se han perseguido con mayor interés en investigación destaca la búsqueda de proteínas fluorescentes rojas ("red fluorescent protein", RFP), obteniéndose en la naturaleza la proteína fluorescente procedente de *Discosoma* sp. DsRed. Sin embargo, la principal dificultad en el empleo de esta proteína es que es un tetrámero que madura lentamente. En este sentido, se han obtenido proteínas fluorescentes monoméricas por ingeniería de proteínas mediante mutagénesis dirigida en la secuencia genética de la proteína fluorescente roja DsRed (Shaner, Campbell, Steinbach, Giepmans, Palmer y Tsien (2004) Nature Biotechnol. 22: 1567-1572). De las proteínas autofluorescentes obtenidas, destaca la proteína monomérica mCherry (mRFP), que tiene la ventaja de madurar rápida y completamente, poseer una elevada fotoestabilidad y una excelente resistencia al pH ácido (pK_a < 4,5). Además, los espectros óptimos de excitación y emisión de GFP (488 nm y 511 nm, respectivamente) y mRFP (587 nm y 610 nm, respectivamente) no solapan entre sí lo que hace posible su detección simultánea.

Mientras la oferta comercial de vectores que contienen el gen que codifica para GFP (*gfp*) es muy amplia, existen pocos vectores disponibles que codifiquen para proteínas fluorescentes rojas. El vector Cherry™Express, comercializado por Evrogen (Moscú, Rusia), se compone de una secuencia que codifica un polipéptido rojo de 11 kDa procedente de la región de unión al grupo hemo del citocromo. Por su parte, la empresa Clontech (Mountain View, California, EE UU) comercializa un vector denominado pmCherry1 que contiene la secuencia que codifica la proteína mRFP optimizada en codones para la expresión de genes humanos, y que permite la inserción y evaluación de promotores funcionales. Dicho vector puede propagarse en *E. coli* y permite la expresión en células eucariotas.

En la bibliografía científica, se ha descrito la expresión de mRFP en diferentes especies de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas* spp., *Edwarsiella tarda* y *E. coli* (Lagendijk, Validov, Lamers, de Weert, Bloemberg y GV (2010) FEMS Microbiol. Lett. 305: 81-90) y en Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (Malone, Boles, Lauderdale, Thoendel, Kavanaugh y Horswill (2009) J. Microbiol. Meth. 77: 251-260). Ambos estudios están enfocados al empleo de la proteína autofluorescente como marcador para la visualización de las comunidades de estas bacterias formando biopelículas. En estos estudios, también se emplean otros marcadores fluorescentes con GFP para diferenciar comunidades bacterianas constituidas por mezclas de diferentes especies o la misma especie expresando diferentes propiedades. El gen *gfp* también se ha usado como marcador para el seguimiento *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas empleadas como vehículos de vacunas orales (Geoffroy, Guyard, Quatannens, Pavan, Lange y Mercenier (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66: 383-391).

Se ha descrito la construcción de vectores utilizados para la caracterización de promotores divergentes en bacterias Gram-negativas, empleando como genes marcadores de clonación los que codifican para actividades enzimáticas como β-glucuronidasa y β-galactosidasa (Parry, Sharma y Terzaghi (1994) Gene 150: 105-109; Jiwaji, Matcher y Dorrington (2008) S. Afr. J. Sci. 104: 305-307) y β-glucuronidasa y GFP (Zhang, Gal, Zhu, Chen y Jiang (2010) Front. For. China 3: 112-116). El gen *lacZ* también se ha empleado como gen reportero para evaluar la actividad de promotores divergentes en *Saccharomyces cerevisiae* (Partow, Siewers, Bjorn, Nielsen y Maury (2010) Yeast 27: 955-964). Sin embargo, la verificación de la clonación y la detección de expresión de promotores en la mayoría de estos ejemplos requieren la evaluación de la actividad enzimática empleada como marcador de manera discontinua y no simultánea con el crecimiento.

En bacterias lácticas se han descrito vectores que comprenden el gen que codifica para la GFP así como genes marcadores de clonación que codifican para actividades enzimáticas, como es el caso del vector pAK80 y sus derivados que incluyen el gen de la β-galactosidasa (Margolles, Moreno, Ruiz, Marelli, Magni, de los Reyes Gavilán, Ruas Madiedo (2010) J. Biosci. Bioeng. 109: 322-324). Sin embargo, la proteína GFP presenta una baja resistencia

a la acidez (pK_a > 6,6) por lo que su uso en bacterias lácticas representa una dificultad ya que dichas bacterias tienden a acidificar el medio y, por lo tanto, el medio necesariamente debe contener tampones para mantener el pH en valores próximos a la neutralidad.

Lactococcus lactis es una bacteria Gram-positiva del orden *Lactobacillales* y constituye una de las especies más representativas dentro de las bacterias lácticas. Además, se caracteriza por haber sido consumida de manera segura en los alimentos, sobre todo en quesos, a lo largo de la historia de la humanidad. En conjunto, *L. lactis* es la bacteria láctica más ampliamente utilizada en estudios fisiológicos y de expresión debido a las posibilidades de ser manipulada mediante ingeniería genética. En las últimas décadas, esta especie ha demostrado un valioso papel como vehículo seguro para la expresión de proteínas terapéuticas y vacunas y para su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y alergias (Rottiers, De Smedt y Steidler (2009) Int. Rev. Immunol. 28: 465-486).

Al igual que *L. lactis*, *Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram-positiva del orden *Lactobacillales,* sin embargo, esta especie está surgiendo en los últimos tiempos como patógeno nosocomial en pacientes inmunocomprometidos, detectándose clones adaptados a hospitales debido a sus características de resistencia múltiple a antibióticos y a la adquisición de genes de virulencia (Sava, Heikens y Huebner (2010) Clin. Microbiol. Infect. 16: 533-540).

Por todo lo aquí descrito, en la actualidad existe la necesidad de vectores que contengan genes que codifiquen para fluorescencia roja y sean útiles en bacterias lácticas (orden *Lactobacillales*) de interés agroalimentario y sanitario. Los vectores que combinan fluorescencia verde (mediante el uso del gen *gfp*) con genes que codifican para actividades enzimáticas presentan la desventaja de no poder ser utilizados para una detección simultánea de expresión a partir de dos promotores divergentes ni tampoco es posible utilizarlos para la detección simultánea de expresión y crecimiento celular. Se hace necesario, por lo tanto, el desarrollo de una nueva herramienta que combine dos genes que codifiquen para proteínas fluorescentes que permitan la detección rápida y simultánea de regiones promotoras bidireccionales en bacterias lácticas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a vectores que permiten la detección rápida y simultánea de regiones promotoras bidireccionales en bacterias lácticas, mediante la expresión de fluorescencia con dos proteínas autofluorescentes empleadas como marcadores y colocadas en sentido divergente.

Los vectores de la invención acrecientan las herramientas moleculares disponibles para los estudios de expresión y regulación génica de bacterias lácticas de las especies *L. lactis* y *E. faecalis*. Además, los vectores de la invención son funcionales en *E. coli*, lo que facilita en gran manera los procedimientos de clonación.

Los vectores de la presente invención contienen el gen que codifica la proteína autofluorescente roja mCherry (mRFP) cuya secuencia nucleotídica ha sido optimizada en la presente invención para su expresión heteróloga en bacterias Gram-positivas de alto contenido en adenina (A) y timina (T) (A+T), como es el caso de las bacterias lácticas. Por este motivo, el primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia nucleotídica que consiste en la secuencia del gen *mrfp* que codifica una proteína fluorescente roja, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 1. En la presente invención, "la secuencia del gen *mrfp"* se refiere a la secuencia del gen que codifica para la proteína mRFP que contiene cuatro codones más en el extremo 5' producto de la optimización en bacterias lácticas y que además incluye en los extremos los sitios de restricción de las enzimas *Sma*I y *Sal*I.

En adelante nos referiremos a SEQ ID NO: 1 como la "secuencia de la invención" y a la proteína que codifica la secuencia de la invención como a la "proteína de la invención".

Se entiende por optimización, el uso de codones que favorecen un aumento del rendimiento de la producción de la proteína fluorescente. En algunos casos, dicha optimización es necesaria para que exista la propia expresión de la proteína heteróloga. En la presente invención se refiere al uso de codones de alto contenido en adenina y timina (A+T) que permiten la expresión de la proteína de la invención en las bacterias lácticas. Por lo tanto, "secuencia optimizada" en la presente invención se refiere a la secuencia del gen *mrfp* que contiene codones de alto contenido en A+T.

Se entiende por codones, los tripletes de nucleótidos que codifican, según el código genético conocido por cualquier experto en la materia, para un determinado aminoácido o para una señal de terminación de la traducción.

El término "alto contenido en A+T" se refiere a rico en adenina y timina. En la presente invención se refiere a que el gen optimizado *mrfp* al que se refiere la SEQ ID NO: 1 contiene mayor proporción de adenina y timina que de citosina (C) y guanina (G) que el gen *mrfp* sin optimizar.

Se entiende por "expresión heteróloga" aquella expresión de una secuencia génica que no pertenece al mismo organismo que el utilizado para su expresión. En la presente invención la mRFP es originaria de un organismo distinto al utilizado para su expresión, por lo que la expresión del gen *mrfp* en bacterias lácticas es una expresión heteróloga.

Se entiende por proteína fluorescente aquella proteína que tras ser excitada con una determinada longitud de onda, emite luz de una longitud de onda mayor. En la presente invención los términos “fluorescente” y “autofluorescente” se utilizan indistintamente.

La proteína fluorescente roja mCherry (mRFP; número de acceso en GenBank AAV52164) es una proteína monomérica derivada de la proteína fluorescente roja procedente de *Discosoma* sp. (proteína DsRed del coral, número de acceso en GenBank Q9U6Y8) (Shaner, Campbell, Steinbach, Giepmans, Palmer y Tsien (2004) Nature Biotechnol. 22: 1567-1572). La mRFP posee una excelente resistencia al pH ácido (pK_a < 4,5) lo que la hace potencialmente útil para su uso en bacterias lácticas. La proteína mRFP posee una longitud de onda óptima de excitación a 587 nm y una longitud de onda óptima de emisión a 610 nm, para las que la intensidad de fluorescencia es máxima. mRFP emite luz en la zona roja del espectro visible. La proteína de la invención es la mRFP que debido al proceso de optimización contiene cuatro aminoácidos extra en su extremo amino terminal, Metionina-Asparagina-Serina-Aspartato (MNSD) (SEQ ID NO: 4) que no afectan significativamente a sus características tales como pK_a o espectros de excitación y emisión. La proteína de la invención tiene una longitud de onda máxima de excitación de 587 nm y de emisión de 612 nm.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica recombinante que comprende la secuencia de la invención.

Se entiende por “secuencia nucleotídica recombinante” una construcción genética de DNA que codifica la secuencia de la invención y que comprende material genético de diferentes organismos, por ejemplo material genético de *Discosoma* sp. y de *L. lactis*. La presente invención también se refiere a la construcción genética de RNA que comprende el RNA que se transcribe a partir de la secuencia de la invención. La secuencia nucleotídica recombinante puede estar comprendida en un vector donde dicho vector es un plásmido.

En la presente invención se han utilizado las herramientas moleculares conocidas por cualquier experto en la materia para generar los vectores de la invención, entre ellas el clonaje y la utilización de enzimas de restricción. Por este motivo, una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia que además comprende al menos una secuencia reconocida por al menos una enzima de restricción.

Una secuencia reconocida por una enzima de restricción se entiende que se refiere a un sitio o lugar que reconoce una endonucleasa que es capaz de cortar los enlaces fosfodiéster de la cadena de desoxirribonucleótidos generando un corte en la cadena del ácido desoxirribonucléico (ADN). Por ejemplo secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Sma*I, *Sal*I, *Bgl*II, *Xho*I, *Bam*HI, *Pst*I y *Eco*RI

La presente invención también se refiere a secuencias nucleotídicas que comprenden, además de la secuencia de la invención, la secuencia del gen *gfp,* que codifica la proteína fluorescente verde (GFP). En la presente invención, la orientación de ambas proteínas autofluorescentes es divergente, es decir en sentido opuesto, estando el extremo 5’ de ambas secuencias nucleotídicas más cercano entre sí que el extremo 3’.

La proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”, GFP) es una proteína aislada de *Aquorea victoria* que emite luz en la zona verde del espectro visible. El espectro de excitación y de emisión de GFP es 488 nm y 511 nm, respectivamente. El gen *gfp* utilizado en la presente invención se refiere a la secuencia SEQ ID NO: 8.

Por este motivo, una realización aún más preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica de la invención que además comprende el gen *gfp,* que codifica la proteína fluorescente verde (GFP), donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 8. En adelante nos referiremos a la secuencia de esta realización preferida como la “secuencia nucleotídica segunda de la invención”.

La secuencia nucleotídica del segundo aspecto de la invención además puede comprender al menos una secuencia reconocida por al menos una enzima de restricción entre los genes *mrfp y gfp*.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un vector que comprende la secuencia nucleotídica del primer o segundo aspecto de la invención. En adelante nos referiremos a este vector como el “vector primero de la invención”.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector que además comprende un replicón funcional en *L. lactis*. En adelante nos referiremos a este vector como el “vector segundo de la invención”.

En la presente invención se entiende por replicón la secuencia de ADN mínima requerida para la replicación del vector o plásmido en un organismo. Dicho replicón puede ser por ejemplo, el replicón del plásmido pCT1138 que es funcional tanto en *L. lactis* como en *E. faecalis*.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector que además comprende el replicón del plásmido p15A que es funcional en *Escherichia coli.* En adelante nos referiremos a este vector como el “vector tercero de la invención”.

En adelante nos referiremos a “vector de la invención” como al vector primero, segundo o tercero de la presente invención.

Se entiende por vector una secuencia de ADN correspondiente a un sistema de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de la invención, operativamente enlazada con, al menos, sitios de corte o un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia, y con otras secuencias para regular su transcripción tales como, por ejemplo, señales de inicio o estructuras secundarias. Preferentemente el vector es un plásmido.

Por estos motivos, una realización preferida tanto del vector primero, del vector segundo y del vector tercero de la invención se refiere a un vector donde la secuencia nucleotídica está unida operativamente a al menos una secuencia reguladora de la expresión génica.

La secuencia reguladora de la expresión génica se puede seleccionar de entre:

a) un promotor, o

b) una señal de inicio de la transcripción.

Un promotor, o región promotora, es una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen determinado (secuencias nucleotídicas). En la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de al menos las secuencias nucleotídicas del primer o del segundo aspecto de la invención. Las secuencias promotoras pueden ser unidireccionales o bidireccionales. Un promotor unidireccional es aquel que controla la transcripción de un gen o de más genes que se sitúan en tándem con el primero, por ejemplo el promotor silvestre P_X (SEQ ID NO: 10) de *S. pneumoniae* (Nieto, Espinosa y Puyet (1997) J. Biol. Chem. 272: 30860-30865). “En tándem” se refiere a que el extremo 3’ del primer gen va seguido, bien consecutivamente o separados por una determinada secuencia nucleotídica, por el extremo 5’ del segundo gen. Un promotor bidireccional se refiere a la región promotora que controla la transcripción en dos direcciones opuestas, por ejemplo la secuencia que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 que actúa como promotor bidireccional (De la Plaza, Peláez y Requena (2009) J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17: 96-100). Es decir, que un promotor bidireccional dirige la transcripción de dos genes situados de manera divergente, es decir en sentido opuesto, estando el extremo 5’ de ambas secuencias nucleotídicas más cercano entre sí que el extremo 3’. En la presente invención se utilizan los términos “promotor” y “región promotora” indistintamente.

Además, los promotores en la presente invención pueden ser constitutivos o inducibles. El término “inducible”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la posibilidad de que el promotor tenga un elemento de control que permita activar o desactivar (reprimir) la transcripción del gen que regula, en presencia de un factor externo al promotor.

Los promotores a los que se refiere la presente invención controlan al menos la transcripción de una de las proteínas fluorescentes. Por lo que, otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el promotor controla al menos la transcripción de una de las proteínas fluorescentes.

Por todo lo aquí descrito, otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el promotor es un promotor unidireccional.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el promotor unidireccional es el promotor P_X de *Streptococcus pneumoniae*, cuya secuencia es SEQ ID NO: 10.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el vector es el vector derivado de pAK80 que carece del gen que codifica para β-galactosidasa, es el vector de la invención denominado pAKmRFP-P_X.

pAK80 es un plásmido que contiene como marcador β-galactosidasa, presenta como marcador de selección la resistencia a eritromicina y contiene dos replicones funcionales respectivamente en bacterias Gram-positivas (*L. lactis* y *E. faecalis*) y Gram-negativas (*E. coli*) (Israelsen, Madsen, Vrang, Hansen y Johansen (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61:2540-2547).

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el promotor es bidireccional.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el promotor bidireccional es la región promotora que comprende los promotores divergentes P_{KivD} y $P_{RmaF\text{-}RlrC}$ (P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) de *L. lactis*, cuya secuencia es SEQ ID NO: 13.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un vector donde el vector es el vector derivado de pAK80 que carece del gen que codifica para β-galactosidasa, es el vector de la invención denominado pAKmRFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende la secuencia nucleotídica del primer y segundo aspectos de la invención o el vector según el tercer aspecto de la invención. En adelante nos

referiremos a esta célula como la “célula de la invención”. La célula de la invención es preferentemente una bacteria. La introducción de dichas construcciones génicas se puede realizar con los métodos conocidos en el estado de la técnica.

Un realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la célula donde dicha célula es una bacteria Gram-positiva. Preferiblemente es una bacteria del orden *Lactobacillales*. Más preferiblemente la célula se selecciona entre *L. lactis* o *E. faecalis.*

El término “Gram-positiva” se refiere a aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular. La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior y que es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram. A diferencia de las Gram-negativas, las Gram-positivas no presentan una segunda membrana lipídica externa a la pared celular y esta pared es mucho más gruesa.

Las bacterias lácticas son bacterias Gram-positivas del orden *Lactobacillales* que producen ácido láctico a partir de azúcares. La especie *L. lactis* pertenece a la familia *Streptococcaceae*, género *Lactococcus*. La presente invención también se refiere a las subespecies de *L. lactis*, por ejemplo *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *horniae*.

Mediante estrategias de la biotecnología conocidas por el experto en la materia, se puede utilizar *E. coli* para la propagación del vector tercero de la invención, por lo que la célula de la invención también puede referirse a *E. coli*.

Otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, se refiere a la célula de la invención que al comprender la proteína de la invención emite fluorescencia roja; fluorescencia verde por expresión de la proteína GFP, lo que sucedería en el caso de que no se expresara mRFP; o fluorescencia marrón por expresión simultánea de ambas proteínas.

En el caso de la utilización de manera simultánea de los genes *mrfp* y *gfp,* en la presente invención se controla el pH del medio de cultivo de manera que se mantenga un pH adecuado para la expresión de ambas proteínas de modo que las posibles diferencias encontradas en la expresión no se deban a una condición que ponga en desventaja la expresión de ninguna de las dos proteínas fluorescentes.

También se refiere esta invención, a la población celular que comprende la célula de la invención. En adelante nos referiremos a ésta como la “población celular de la invención”.

Las aplicaciones tanto de las secuencias de la invención, como de los vectores de la invención o de las células de la invención podrían englobar diferentes funciones relacionadas tanto con características biotecnológicas de interés agroalimentario y de funcionalidad probiótica, como para estudios de seguridad alimentaria y farmacéuticos.

Los vectores de la invención son utilizables, para el clonaje y caracterización de un promotor mediante la detección de la fluorescencia de la mRFP o de dos promotores divergentes mediante la detección de dos proteínas autofluorescentes, mRFP y GFP. Además, los vectores también permiten evaluar de forma cuantitativa la regulación de la expresión génica a partir del promotor(es) clonado(s) en ellos. Así, la generación de fusiones transcripcionales utilizando los vectores de expresión antedichos permite además la evaluación *in situ* de la expresión génica a partir del promotor o los promotores durante el crecimiento de las bacterias recombinantes portadoras al poder evaluarse simultáneamente fluorescencia y densidad óptica mediante espectrofluorimetría y espectrofotometría. Este hecho implica la detección de la clonación de los promotores y evaluación de expresión no sólo de manera específica y cuantitativa, sino también de manera dinámica en el tiempo.

Por lo aquí descrito, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico del primer o segundo aspecto de la invención o del vector del tercer aspecto de la invención para la detección y caracterización de un promotor. La región promotora puede ser unidireccional o bidireccional.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del ácido nucleico del primer o segundo aspecto de la invención o del vector del tercer aspecto de la invención para la transcripción de al menos un polinucleótido (también denominado “polinucleótido de interés”). Es decir, su uso para transcripción heteróloga. Los polinucleótidos podrían ser, polinucleótidos de interés en el sector alimentario o sanitario relacionado con bacterias lácticas. Por ejemplo, en el caso de utilizar los vectores de la invención en *L. lactis*, los polinucleótidos serían los que codificaran para proteínas de interés agroalimentario como enzimas, nutracéuticos, bacteriocinas, vitaminas, exopolisacáridos, etc. En el caso de utilizar los vectores de la invención en *E. faecalis*, los polinucleótidos de interés podían ser, por ejemplo, los que codifiquen la resistencia a antibióticos, hemolisinas, proteínas de agregación y adhesión, citolisinas, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las células de la invención o de la poblaciones celulares que comprenden la célula de la invención para la determinación de la capacidad colonizadora de dichas células en un cultivo mixto bacteriano o en co-cultivos con células eucariotas aisladas o en cultivo de tejido biológico aislado o en un modelo animal. Por ejemplo, el modelo animal se podría referir a pez cebra o a *Caenorhabditis elegans***.**

En la presente invención también se describen los procedimientos de detección de fluorescencia de las células de la invención. Desde procedimientos visuales de las colonias transformantes que permiten la selección directa de los clones que han adquirido la región promotora, hasta la evaluación mediante espectrofluorimetría y espectrofotometría de las condiciones de regulación de promotores durante la expresión *in vivo* y en función de variación de condiciones ambientales y fisiológicas. En la presente invención también se describe el procedimiento mediante microscopía de fluorescencia que permite diferenciar especies bacterianas marcadas con diferentes fluorescencias en cultivos mixtos y en estudios de interacción con cultivos de líneas celulares humanas.

Por estos motivos, otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección de la célula del cuarto aspecto de la invención que comprende detectar la fluorescencia de dichas células. Una realización preferida se refiere al método donde la detección se lleva a cabo por medio de espectrofluorimetría o por microscopía de fluorescencia, técnicas conocidas ampliamente por cualquier experto en la materia. Otra realización aún más preferida se refiere al método donde la fluorescencia se detecta en colonias de dichas células.

Por todo lo anteriormente descrito, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de detección y caracterización de promotores que comprende:

a. transformar una célula hospedadora con el vector de la invención,

b. cultivar la célula del paso (a) en condiciones adecuadas,

c. determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente,

d. comparar la fluorescencia obtenida en el paso (c) con la fluorescencia emitida por una célula control.

La transformación de la célula hospedadora, célula de la invención, con el vector de la invención se realiza utilizando las herramientas conocidas por cualquier experto en la materia, como por ejemplo, mediante electroporación.

Se entiende por “condiciones adecuadas” aquellas condiciones que sean necesarias para el crecimiento de la célula de la invención y de expresión de las secuencias nucleotídicas comprendidas en los vectores de la invención. El medio de cultivo adecuado de la célula hospedadora transformada al que se refiere cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, así como las condiciones de cultivo (como por ejemplo, pero sin limitarse, nutrientes, pH o temperatura) se seleccionan en función de la naturaleza de la célula hospedadora.

Se entiende por “célula control” aquella célula que haya sido transformada con un vector control, siendo éste un vector que carezca de las características diferenciales del vector utilizado en el ensayo.

El término “comparar” se refiere a realizar un estudio para determinar las diferencias estadísticas significativas entre la célula de la invención y la célula control. En el caso de realizar un estudio estadístico, se pretende recolectar datos que muestren una desviación significativa entre los resultados de ambas células.

En la presente invención “diferencia estadísticamente significativa” se refiere a que existen diferencia estadísticas entre los valores comparados, siendo la probabilidad estadística al menos mayor o menor que 0,05 ($p>0,05$ o $p>0.05$) y obteniéndose ésta según el test estadístico aplicable a cada caso.

La presente invención también se refiere a un método de detección de la expresión de polinucleótidos, como por ejemplo enzimas, bacteriocinas, proteínas de membrana, al mismo tiempo que se detecta el crecimiento de la célula de la invención. Por lo que otro aspecto de la presente invención se refiere a método de detección de la expresión de polinucleótidos que comprende:

a) insertar en el vector de la invención un polinucleótido que está controlado por el mismo promotor que regula la transcripción del gen que codifica la proteína fluorescente,

b) transformar una célula hospedadora con el vector resultante del paso (a),

c) cultivar la célula del paso (b) en las condiciones adecuadas y

d) determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente simultáneamente a la determinación del crecimiento celular.

Por otra parte, por todo lo descrito anteriormente, otro aspecto de la invención se refiere a un método de determinación de la capacidad colonizadora de las células de la invención o de la población celular de la invención que comprende:

a) cultivar las células en las condiciones adecuadas,

b) poner en contacto las células con bacterias, tejidos o un modelo animal,

c) determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente por espectrofluorimetría o por microscopía de fluorescencia y

d) comparar la fluorescencia determinada en el paso (c) con la fluorescencia emitida por una célula, tejido o animal control que no presentan las mismas características que la célula, tejido, o animal del paso (b)

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende:

a) al menos una secuencia nucleotídica recombinante, que pudiera ser la secuencia del primer aspecto de la invención o la del segundo aspecto de la invención,

b) al menos un vector de la invención, o

c) al menos una célula de la invención

Dicho kit podría ser utilizado para la detección y caracterización de promotores, o para la transcripción de un polinucleótido de interés o para la determinación de la capacidad colonizadora en cultivos mixtos bacterianos o en co-cultivos con células eucariotas aisladas o en cultivo de tejido biológico aislado o en un modelo animal, por lo que la invención también se refiere a los usos aquí descritos del kit.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. **Esquema de construcción de los vectores que contienen el gen *mrfp*.** Se muestra el esquema de construcción de los plásmidos pAKmRFP, pAKmRFP-Px, pAKmRFPGFP y pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ a partir del plásmido pAK80. Se muestra la localización de las secuencias reconocidas por enzimas de restricción útiles presentes en los plásmidos, *Sma*I, *Sal*I, *Bgl*II, *Xho*I, *Bam*HI, *Pst*I y *Eco*RI. Replicon pCT1138, replicón funcional en *L. lactis* y *E. faecalis*. Replicon P15A, replicón funcional en *E. coli*. *ermC*, gen de resistencia a eritromicina. β-gal, gen que codifica para β–galactosidasa. *mrfp*, secuencia de la invención. *gfp*, gen que codifica para la proteína GFP utilizado en la invención. Px, promotor Px. P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$, promotor P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$.

Figura 2.**Detección de fluorescencia roja en bacterias que contienen el vector pAKmRFP-P_X.** Emisión de fluorescencia roja (UFR,◊) de bacterias durante el crecimiento (DO_{480}, □) de *E. coli* DH5α (*E.coli*) (A), *L. lactis* MG1363 (*L. lactis*) (B) y *E. faecalis* JH2-2 (*E. faecalis*) (C) que contienen el vector pAKmRFP-P_X. T, tiempo; h, horas.

Figura 3. **Detección de fluorescencia roja y verde en bacterias que contienen el vector pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$.** Emisión de fluorescencia roja (UFR, ◊) y fluorescencia verde (UFV, ○) durante el crecimiento (DO_{480}, □) de *E. coli* DH5α (*E.coli*) (A), *L. lactis* MG1363 (*L. lactis*) (C) y *E. faecalis* JH2-2 (*E. faecalis*) (E) que contienen el vector pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$. Imágenes por microscopía de fluorescencia de células fluorescentes de *E. coli* DH5α (B), *L. lactis* MG1363 (D) y *E. faecalis* JH2-2 (F) que expresan la proteína fluorescente roja mRFP y la proteína fluorescente verde GFP de la invención. T, tiempo; h, horas.

Figura 4. **Detección de la expresión inducible y represora de P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$.** Emisión de fluorescencia roja (UFR, ◊) y fluorescencia verde (UFV, ○) de *L. lactis* MG1363 *(L. lactis)* que contiene el vector pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ durante el crecimiento (DO_{480}, □) en (A) medio químicamente definido (CDM) que contiene casitona (condiciones represoras) (CDM-r) y en (B) CDM en ausencia de isoleucina (condiciones inductoras) (CDM-i). T, tiempo; h, horas.

Figura 5. **Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia.** Imágenes por microscopía de fluorescencia de células fluorescentes de *E. coli* DH5α(pGreenTIRGFP) (A), que expresan la proteína fluorescente verde GFP utilizada en la invención, y *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-Px) (B) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-Px) (C), que expresan la proteína fluorescente roja mRFP de la invención, que están adheridas a células humanas Caco-2.

EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE LA INVENCIÓN

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: Construcción de plásmidos que comprenden el gen *mrfp*.

El esquema de la construcción se muestra en la figura 1. Para la construcción de los vectores de fusión transcripcional se partió del vector pAK80 (Israelsen, Madsen, Vrang, Hansen y Johansen (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61:2540-2547). El vector pAK80 contiene un origen de replicación procedente del plásmido pCT1138 de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CRL264 que también es funcional en *E. faecalis* (Marelli y Magni (2010) World J. Microbiol. Biotechnol. 26:999-1007). Además, pAK80 contiene el origen de replicación procedente del plásmido p15A de *E. coli* que le confiere carácter de vector lanzadera para poder ser propagado también en *E. coli*. Como marcador para la selección de transformantes, pAK80 contiene el gen *ermC*, que confiere resistencia a eritromicina en *E. coli* y en *L. lactis* y *E. faecalis*.

El vector pAK80 se digirió con las enzimas de restricción *Sma*I y *Sal*I. Uno de los fragmentos de DNA resultante de 7 kb procedente de pAK80, que contiene los 2 orígenes de replicación y el determinante de resistencia a eritromicina, se separó en un gel de agarosa del 0,8%. Posteriormente, el fragmento se purificó (Qiagen) para emplearse como base en la construcción de los plásmidos recombinantes.

El gen que codifica la proteína monomérica con fluorescencia roja mCherry (mRFP), optimizado en codones para la expresión en bacterias Gram-positivas de alto contenido en A+T (SEQ ID NO: 1), se sintetizó químicamente incluyendo en los extremos los sitios de restricción de las enzimas *Sma*I y *Sal*I y se amplificó por PCR. Se emplearon los cebadores específicos, cebador sentido (SEQ ID NO: 2) y cebador antisentido (SEQ ID NO: 3), que contienen, respectivamente, los sitios de restricción *Sma*I y *Sal*I y que están diseñados para generar un amplicón que, precedido por un sitio de unión a los ribosomas necesario para iniciar la traducción de la proteína, comprende el gen (SEQ ID NO: 1) que codifica para la proteína mRFP que se caracteriza por cuatro aminoácidos extra (MNSD) en su extremo amino terminal (SEQ ID NO: 4). Se empleó para la amplificación la enzima Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase (Finnzymes) para obtener una copia fidedigna del fragmento original. El producto de la reacción resultante de 0,8 kb se ligó utilizando la DNA ligasa del bacteriofago T4 (Fermentas) con el fragmento de 7 kb procedente de pAK80 para obtenerse el plásmido de 7,8 kb llamado pAKmRFP que fue establecido por transformación en *E. coli* DH5α y selección con 250 µg/ml de eritromicina en placas de Luria broth (LB)-agar. La fusión del gen que codifica para mRFP en pAKmRFP se localiza a continuación de un sitio de clonación múltiple (SCM) (SEQ ID NO: 5). La correcta secuencia nucleotídica del gen optimizado de mRFP y su sitio de unión a los ribosomas presente en pAKmRFP fue verificada por secuenciación del plásmido empleando los cebadores sentido (SEQ ID NO: 2) y antisentido (SEQ ID NO: 3).

El plásmido pAKmRFP contiene, por tanto, el gen optimizado de expresión de mRFP en bacterias con ADN de alto contenido en A+T precedido por un SCM que contiene las zonas de restricción para *Bgl*II, *Xho*I, *Pst*I, *Bam*HI, y *Sma*I (Fig. 1). El plásmido pAKmRFP queda así disponible para su uso como vector de fusión transcripcional de promotores funcionales en *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*.

Para construir el vector pAKmRFPGFP, el gen *gfp* que codifica la proteína autofluorescente GFP se amplificó por PCR a partir del plásmido pGreenTIR, donde el gen se había optimizado en codones para su expresión en procariotas (Miller y Lindow (1997) Gene 191: 149-153), mediante amplificación con los cebadores específicos sentido (SEQ ID NO: 6) y antisentido (SEQ ID NO: 7), diseñados para incluir en la clonación el gen *gfp* (SEQ ID NO: 8) precedido de su sitio de unión a los ribosomas y para que incorporasen en los extremos 5' y 3´ del amplicón, respectivamente, los sitios de restricción para *Pst*I y *Xho*I. El producto de amplificación obtenido con la enzima Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase de 0,77 kb se ligó mediante DNA ligasa de T4 con el plásmido pAKmRFP linearizado por digestión también con las enzimas *Pst*I y *Xho*I para generar el plásmido pAKmRFPGFP de 8,6 kb. La secuencia nucleotídica correcta del gen *gfp* insertado en pAKmRFPGFP fue verificada por secuenciación del plásmido empleando el cebador sentido (SEQ ID NO: 6) y antisentido (SEQ ID NO: 7). El plásmido pAKmRFPGFP contiene, por tanto, el gen *gfp* y el gen optimizado de expresión de mRFP en orientación divergente y a ambos lados de un SCM (sitio de clonación múltiple) (SEQ ID NO: 9) que contiene los sitios de restricción para *Pst*I, *Bam*HI, y *Sma*I (Fig. 1). El plásmido pAKmRFPGFP queda así disponible para su uso como vector de fusión transcripcional a promotores divergentes funcionales en *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*.

EJEMPLO 2: Identificación de estirpes de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis* que expresan el gen que codifica para mRFP mediante la clonación bajo el promotor P_X. Construcción del vector pAKmRFP-P_X.

Para evaluar la expresión de mRFP durante el crecimiento de bacterias lácticas, se clonó el promotor silvestre P_X (SEQ ID NO: 10) de *S. pneumoniae* (Nieto, Espinosa y Puyet (1997) J. Biol. Chem. 272: 30860-30865) en el vector pAKmRFP para obtener el vector pAKmRFP-P_X (Fig. 1). La región promotora de *S. pneumoniae* se obtuvo mediante la amplificación con la enzima Phusion Hot Start High Fidelity Polimerase y los cebadores específicos sentido (SEQ ID NO: 11) y antisentido (SEQ ID NO: 12), que contienen los sitios de restricción *Pst*I y *Bam*HI, respectivamente. La región promotora de 0,5 kb y pAKmRFP se digirieron con ambas enzimas *Pst*I y *Bam*HI y se ligaron utilizando DNA ligasa de T4. El plásmido vector resultante de 8,3 kb se empleó para transformar *E. coli* DH5α. Se obtuvieron colonias de transformantes resistentes a eritromicina con una intensa coloración rojiza que verificaba la expresión de mRFP bajo el control de P_X (Fig. 2A). La correcta fusión de P_X con el gen que codifica para mRFP se confirmó mediante secuenciación del plásmido pAKmRFP-P_X con los cebadores ForP_M y RevmRFP. Para comprobar la utilidad de mRFP como marcador de clonación y expresión en bacterias lácticas, se transformaron *L. lactis* MG1363

y *E. faecalis* JH2-2 con pAKmRFP-P_X. La clonación de promotores y expresión de mRFP en estas especies se observó visualmente por la coloración de las colonias transformantes con un color rojo intenso en *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X) y asalmonado en *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X).

La determinación de expresión de fluorescencia mRFP bajo el control del promotor P_X durante el crecimiento celular se monitorizó en las estirpes *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X), *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X) y *E. coli* DH5α(pAKmRFP-P_X) simultáneamente mediante espectrofluorimetría (medidas de excitación a 587 nm y emisión a 612 nm) y espectrofotometría (medidas de densidad óptica a 480 nm, DO_{480}) a intervalos de 1 h de incubación a 37 °C para *E. coli* y *E. faecalis* y a 30 °C para *L. lactis* en medio químicamente definido (CDM) (Otto, ten Brink, Veldkamp y Konings (1983) FEMS Microbiol. Lett. 16: 69-74; Poolman y Konings (1988) J. Bacterial. 170: 700-707). En el CDM se eliminó la riboflavina por interferir con la lectura de fluorescencia y se le añadió glucosa al 0,5% y tampón MOPS (ácido 3-(N-morpholino)propanesulfónico) 0,19 M para mantener neutro el pH del medio durante la incubación de los cultivos. La Fig. 2 muestra los valores de fluorescencia roja (UFR) correspondientes a los resultados de emisión de fluorescencia de las estirpes *E. coli* DH5α(pAKmRFP-P_X) (2A), *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X) (2B) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X) (2C) corregidos con los valores obtenidos de las estirpes isogénicas no portadoras de pAKmRFP-P_X. En los tres casos, se observó que la expresión de fluorescencia evolucionaba de manera paralela al crecimiento de las estirpes.

EJEMPLO 3: Identificación de estirpes de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis* que expresan simultáneamente los genes que codifican para mRFP y GFP mediante la clonación bajo una región promotora bidireccional. Construcción del plásmido pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$.

Para evaluar la expresión simultánea de las fluorescencias de las proteínas GFP y mRFP como marcadores de clonación de regiones conteniendo promotores divergentes, se procedió a la clonación en el SMC del vector pAKmRFPGFP de la región que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (De la Plaza, Peláez y Requena (2009) J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17: 96-100). Esta región posee dos presuntas secuencias consenso de promotores con polaridad divergente, una en dirección al gen *kivD* y la otra en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes *rmaF* y *rlrC* pertenecientes a las familias de reguladores MarR y LysR, respectivamente.

La región denominada P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$ que contiene los promotores divergentes P_{KivD} y $P_{RmaF\text{-}RlrC}$ (SEQ ID NO: 13) se amplificó empleando ADN cromosómico de *L. lactis* IFPL730 y los cebadores específicos sentido (SEQ ID NO: 14) y antisentido (SEQ ID NO: 15), en los que se incorporó el sitio de restricción para *Bam*HI. El fragmento de la región promotora P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$ de 0,28 kb y pAKmRFPGFP se digirieron con *Bam*HI y se ligaron utilizando DNA ligasa de T4. El plásmido vector resultante de 8,9 kb, pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$, se empleó para transformar *E. coli* DH5α. Se obtuvieron transformantes resistentes a eritromicina con una coloración marrón que evidenciaba la expresión simultánea de mRFP y GFP bajo el control de P_{KivD} y $P_{RmaF\text{-}RlrC}$, respectivamente, validando así la funcionalidad de los dos promotores, y que se diferenciaban claramente de la expresión sólo de mRFP o GFP (resultados no mostrados). La correcta fusión de P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$ con los genes que codifican para mRFP y GFP se confirmó mediante la secuenciación del plásmido pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$ con los cebadores ForP_{KivD}, RevP_{KivD}, RevmRFP y RevGFP. El plásmido se utilizó para transformar *L. lactis* MG1363 y *E. faecalis* JH2-2 en donde se verificó la funcionalidad del vector como marcador de clonación y expresión en bacterias lácticas de regiones promotoras bidireccionales. El carácter regulable de la región promotora en *L. lactis* (ver ejemplo 4) resultó en una marcada expresión a partir de P_{KivD} y, por tanto, en una mayor expresión de mRFP que se evidencia en una coloración más rojiza de las colonias de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) en comparación con las de *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) y *E. coli* DH5α(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$).

La diferente fuerza de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF\text{-}RlrC}$, y la consiguiente expresión de GFP y mRFP, se cuantificó por medida de fluorescencia durante el crecimiento celular a 37 °C para *E. coli* DH5α(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) (Fig. 3A) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) (Fig. 3C) y a 30 °C para *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) (Fig. 3E) en CDM sin riboflavina. La incorporación de glucosa al 0,5% y de tampón MOPS 0,19 M, que permite mantener el pH del cultivo alrededor de 7,0, evita la pérdida de fluorescencia del fluoróforo procedente de GFP que se produce a valores de pH ácidos. Se tomaron simultáneamente medidas de fluorescencia de GFP (excitación a 488 nm y emisión a 511 nm) y de mRFP (excitación a 587 nm y emisión a 612 nm), así como de densidad óptica (medidas DO_{480}), a intervalos de 1 h durante 42 h de incubación (Fig. 3). De igual forma que se había observado en las colonias crecidas en placas, la expresión de mRFP fue superior en *L. lactis* en relación a la observada en las otras dos especies y siguió incrementando durante la fase estacionaria (Fig. 3C). La hipótesis de que la mayor expresión de mRFP en *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) se debía a la fuerza del promotor P_{KivD}, en contraposición a que las diferencias de emisión de fluorescencia podrían ser debidas a la mayor sensibilidad al pH de GFP que mRFP (aunque el pH del cultivo se mantuvo estable entre 6,7-6,9 durante todo el tiempo de incubación), se demostró mediante la clonación de la región promotora P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$ en el plásmido pAKmRFPGFP en el sentido contrario, de tal manera que las expresiones de .mRFP y GFP quedaran controladas por los promotores $P_{RmaF\text{-}RlrC}$ y P_{KivD}, respectivamente. Los resultados mostraron que la expresión de GFP fue superior a la de mRFP (resultados no mostrados), confirmando que las diferencias en la expresión de fluorescencia se debieron a la mayor fuerza del promotor P_{KivD}.

La expresión de fluorescencia por GFP y mRFP fue equivalente en *E. coli* DH5α(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF\text{-}RlrC}$) (Fig. 3A), registrándose valores elevados en ambos casos desde el inicio del crecimiento. Esta característica

evidencia el color marrón de las colonias de esta estirpe de *E: coli* DH5α. Por otro lado, *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) mostró mayores valores de expresión de GFP que de mRFP (Fig. 3E), observándose por tanto una coloración más verdosa de las colonias crecidas en placa (resultados no mostrados). En ambos casos se observó que la fluorescencia de GFP y mRFP evolucionaba de manera paralela al crecimiento de las estirpes.

EJEMPLO 4: Detección de la expresión inducible y represora de P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ mediante evaluación simultánea de fluorescencia procedente de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$).

La estirpe de *L. lactis* MG1363 portadora del vector pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ se creció en medio M17 suplementado con glucosa al 0.5% y 5 μg/ml de eritromicina hasta una DO_{600} de 1,0. Se sedimentaron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con solución salina (0,85%) y finalmente se resuspendieron en CDM sin isoleucina (medio inductor) o CDM con casitona (1,5%). Se había demostrado previamente que la expresión a partir de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$ en *L. lactis* IFPL730 está afectada por la presencia de aminoácidos ramificados y por el contenido en péptidos del medio de cultivo, probablemente debido a una regulación mediada por CodY (De la Plaza, Peláez y Requena (2009) J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 17: 96-100). En ese trabajo, los resultados mostraron que la isoleucina es el principal efector de la regulación, de tal manera que la ausencia de isoleucina impide la acción represora de CodY sobre los promotores.

Para la determinación de los niveles de fluorescencia y absorbancia a tiempo real se procedió de igual forma que se ha descrito en el Ejemplo 2, salvo en el medio de crecimiento (CDM) en donde se eliminó el contenido de isoleucina (condiciones inductoras) o se añadió casitona (hidrolizado enzimático de caseína; condiciones represoras y equivalentes al crecimiento en M17). En la Fig. 4 se muestran los resultados de fluorescencia verde (GFP) y roja (mRFP) durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) en los medios inductor y represor, así como los resultados de crecimiento expresados por medida de DO_{480}. Como ya se indicó en el Ejemplo 2, la proporción de la expresión de mRFP incrementaba durante la fase estacionaria, incremento que resultó ser exponencial en condiciones inductoras (Fig. 4B). En condiciones represoras el incremento de fluorescencia de mRFP fue marcadamente inferior (Fig. 4A). Por otro lado, la expresión de GFP también fue superior en condiciones inductoras, aunque no se observó variación significativa en función de la fase de crecimiento. Como se ha detallado en el Ejemplo 3, la clonación de la región promotora P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ en sentido contrario, la fusión de P_{KivD} con GFP y la expresión en condiciones inductoras, dió lugar a incrementos logarítmicos equivalentes en la expresión de GFP durante la fase estacionaria de crecimiento y resultó en la obtención de colonias de *L. lactis* de color verde intenso (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del vector pAKmRFPGFP para monitorizar cuantitativamente y en tiempo real la expresión simultánea de fluorescencia mRFP y GFP en condiciones inductoras o represoras y su utilidad para realizar estudios de expresión génica en *L. lactis*.

EJEMPLO 5. Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia

Para determinar la expresión de las proteínas fluorescentes mRFP y GFP en células individuales de las poblaciones bacterianas se procedió a su detección mediante microscopia de fluorescencia.

Para detectar la expresión de mRFP codificada por el plásmido pAKmRFP-P_X, se analizaron los siguientes cultivos. *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X) crecidos a 30 ºC en medio M17 suplementado con glucosa al 0,5% hasta una DO_{620} de 0,6. *E. coli* DH5α(pAKmRFP-P_X) se creció a 37 ºC con una agitación de 300 revoluciones por minuto en medio LB hasta una DO_{620} de 0,6. Antes de realizar el análisis, muestras de 1 ml de los cultivos se centrifugaron y las bacterias sedimentadas después de ser lavadas con tampón PBS (10 mM Na_2HPO_4, 1mM KH_2PO_4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl), pH 8, se resuspendieron en 0,5 ml del mismo tampón. Estas muestras se analizaron sin fijación previa utilizando un microscopio multiinvivo de óptica invertida, Leica AF6000 LX modelo DMI6000B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipado con una cámara monocroma Hamamatsu CCD C9100-02 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) con un objetivo ×100 y una apertura numérica de 1,6. La iluminación se realizó con una lámpara de mercurio de luz fluorescente de HG 100 W, utilizando un filtro de emisión para dejar pasar la luz roja. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el programa FRET (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

La fluorescencia de la proteína mRFP permitió detectar las células de *L. lactis*, *E. faecalis* y *E. coli* portadoras de pAKmRFP-P_X por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos indicaban que la expresión de la proteína mRFP a partir de pAKmRFP-P_X podría ser utilizada para realizar estudios de competición de *L. lactis*, *E. faecalis* y *E. coli* en distintos hábitats. Por ello, se procedió a evaluar la utilidad del plásmido en estudios de adhesión bacteriana a células epiteliales humanas (Caco-2). Para ello, cultivos exponenciales de *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-Px), *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-Px) y *E. coli* DH5α(pGreenTIRGFP), crecidos como se ha indicado previamente, fueron incubados independientemente o mezclados con células intestinales Caco-2 durante 1 h a 37 ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%. Después del tiempo de incubación, las bacterias no adheridas se eliminaron mediante tres lavados con tampón PBS, pH 8. Las muestras se observaron después del lavado utilizando el microscopio multiinvivo de óptica invertida descrito anteriormente. Los resultados obtenidos con aparecen recogidos en la Fig. 5. La fluorescencia de las proteínas GFP y mRFP permitieron detectar por microscopía de fluorescencia las células de *E. coli* portadora de GFP y de *L. lactis* y *E. faecalis* portadoras de mRFP. Los resultados obtenidos demuestran la

utilidad del plásmido pAKmRFP-Px para realizar estudios de interacción de las bacterias lácticas de *L. lactis* y *E. faecalis* con células eucariotas.

Para detectar la expresión de las proteínas mRFP y GFP codificadas por pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$ se utilizaron bacterias portadoras de dicho plásmido crecidas en CDM sin riboflavina y suplementado con glucosa al 0,5% hasta una DO_{620} de 0,6. Los cultivos de *E. coli* DH5α(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) se crecieron a 37 ºC con una agitación de 300 rpm, mientras que los cultivos de *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) y *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) fueron crecidos a 30 ºC en estático. Un mililitro de cada uno de los cultivos fue sedimentado por centrifugación y las bacterias se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Estas preparaciones fueron analizadas por microscopía de contraste de fase y fluorescencia utilizando un microscopio multiinvivo de óptica invertida. La superposición de las imágenes obtenidas con contraste de fase y con iluminación fluorescente para detectar los dos fluoróforos reveló que tanto en los cultivos de *E. coli* como en los de *L. lactis* y *E. faecalis*, la mayoría de las bacterias mostró fluorescencia debida a la expresión de las proteínas mRFP y GFP (resultados no mostrados). En el caso de *L. lactis* se observó muy baja fluorescencia emitida por mRFP y GFP, resultado esperable al encontrarse las bacterias en condiciones no óptimas para la inducción de la expresión a partir de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$.(fase exponencial de crecimiento y composición del medio de cultivo). Como consecuencia de este resultado, se procedió a comparar la expresión de mRFP y GFP en cultivos de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) crecidos en condiciones de represión y de inducción de la expresión de las proteínas fluorescentes.

Así, *L. lactis* MG1363 (pAKmRFPGFP-P_{KivD}-$P_{RmaF-RlrC}$) se creció a 30 ºC en medio CDM suplementado con 1,5% de casitona (condiciones de represión) hasta una DO_{620} de 0,6. El cultivo fue dividido en dos subcultivos: el primero fue procesado para su análisis por microscopía como se ha descrito previamente; el segundo fue centrifugado y las células fueron resuspendidas en medio CDM sin isoleucina y después 12 horas de incubación a 30 ºC (condiciones de inducción), se tomaron muestras y fueron procesadas para su análisis por microscopía. En la superposición de las imágenes obtenidas por microscopia de contraste de fases y de fluorescencia para detectar mRFP y mGFP se pudo apreciar que las bacterias crecidas en condiciones de represión mostraron tan sólo bajos niveles de expresión de la mRFP, mientras que después de 12 h de inducción se observó una prevalencia de la expresión de mRFP detectándose una coloración marrón de las bacterias (resultados no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Secuencia nucleotídica que consiste en la secuencia del gen *mrfp* que codifica una proteína fluorescente roja, donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 1.

2. Secuencia nucleotídica recombinante que comprende la secuencia nucleotídica según la reivindicación 1.

3. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 2 que además comprende al menos una secuencia reconocida por al menos una enzima de restricción.

4. Secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 que además comprende el gen *gfp,* que codifica la proteína fluorescente verde (GFP), donde dicha secuencia es SEQ ID NO: 8.

5. Secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que además comprende al menos una secuencia reconocida por al menos una enzima de restricción entre los genes *mrfp y gfp.*

6. Vector que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Vector según la reivindicación 6 que además comprende un replicón funcional en *Lactococcus lactis*.

8. Vector según la reivindicación 7 que además comprende un replicón funcional en *Escherichia coli.*

9. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la secuencia nucleotídica está unida operativamente a al menos una secuencia reguladora de la expresión génica.

10. Vector según la reivindicación 9 donde la secuencia reguladora de la expresión génica se selecciona de entre:

    a) un promotor, o

    b) una señal de inicio de la transcripción.

11. Vector según la reivindicación 10 donde dicho promotor controla al menos la transcripción de una de las proteínas fluorescente.

12. Vector según la reivindicación 11 donde el promotor es un promotor unidireccional.

13. Vector según la reivindicación 12 donde el promotor unidireccional es el promotor P_X de *Streptococcus pneumoniae*, cuya secuencia es SEQ ID NO: 10.

14. Vector según la reivindicación 13 donde el vector es el vector derivado de pAK80 que carece del gen que codifica para β-galactosidasa.

15. Vector según la reivindicación 11 donde el promotor es bidireccional.

16. Vector según la reivindicación 15 donde el promotor bidireccional es la región promotora que comprende los promotores divergentes P_{KivD} y $P_{RmaF\text{-}RlrC}$ de *Lactococcus lactis*, cuya secuencia es SEQ ID NO: 13.

17. Vector según la reivindicación 16 donde el vector es el vector derivado de pAK80 que carece del gen que codifica para β-galactosidasa.

18. Célula que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17.

19. Célula según la reivindicación 18 donde dicha célula es una bacteria Gram-positiva.

20. Célula según la reivindicación 19 donde dicha célula se selecciona de entre *Lactobacillus lactis* o *Enterococcus faecalis.*

21. Célula según la reivindicación 18 donde la célula es *Escherichia coli*

22. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde dicha célula emite fluorescencia roja por expresión de la proteína mRFP, fluorescencia verde por expresión de la proteína GFP o fluorescencia marrón por expresión simultánea de ambas proteínas.

23. Población celular que comprende una célula según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22.

24. Uso del ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 5 o del vector según las reivindicaciones 6 a 17 para la detección y caracterización de un promotor.

25. Uso según la reivindicación 24 donde el promotor es unidireccional.

26. Uso según la reivindicación 24 donde el promotor es bidireccional.

27. Uso del ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 5 o del vector según las reivindicaciones 6 a 17 para la transcripción de al menos un polinucleótido.

28. Uso de las células según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 o de la población celular según la reivindicación 23 para la determinación de la capacidad colonizadora de dichas células en un cultivo mixto bacteriano, en co-cultivos con células eucariotas aisladas, en cultivo de tejido biológico aislado o en un modelo animal.

29. Método de detección de la célula según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 que comprende detectar la fluorescencia de dichas células.

30. Método según la reivindicación 29, donde la detección de la fluorescencia se lleva a cabo por medio de espectrofluorimetría o por microscopía de fluorescencia.

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29 ó 30, donde la fluorescencia se detecta en colonias de dichas células.

32. Método de detección y caracterización de promotores que comprende:

    a) transformar una célula hospedadora con el vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17,

    b) cultivar la célula del paso (a) en condiciones adecuadas,

    c) determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente,

    d) comparar la fluorescencia obtenida en el paso (c) con la fluorescencia emitida por una célula control.

33. Método de detección de la expresión de polinucleótidos que comprende:

    a) insertar en el vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 un polinucleótido que está controlado por el mismo promotor que regula la transcripción del gen que codifica la proteína fluorescente,

    b) transformar una célula hospedadora con el vector resultante del paso (a),

    c) cultivar la célula del paso (b) en las condiciones adecuadas y

    d) determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente simultáneamente a la determinación del crecimiento celular.

34. Método de determinación de la capacidad colonizadora de las células según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 o de la población celular según la reivindicación 23 que comprende:

    a) cultivar las células en las condiciones adecuadas,

    b) poner en contacto las células con bacterias, tejidos o un modelo animal,

    c) determinar los niveles de fluorescencia de la proteína fluorescente por espectrofluorimetría o por microscopía de fluorescencia y

    d) comparar la fluorescencia determinada en el paso (c) con la fluorescencia emitida por una célula, tejido o animal control que no presentan las mismas características que la célula, tejido, o animal del paso (b)

35. Kit que comprende:

    a) al menos una secuencia nucleotídica recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

    b) al menos un vector según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, o

    c) al menos una célula según cualquiera de las características 18 a 21.

36. Uso del kit según la reivindicación 35 para la detección y caracterización de promotores, para la transcripción de un polinucleótido de interés o para la determinación de la capacidad colonizadora en cultivos mixtos bacterianos, en co-cultivos con células eucariotas aisladas, en cultivo de tejido biológico aislado o en un modelo animal.

FIG 1

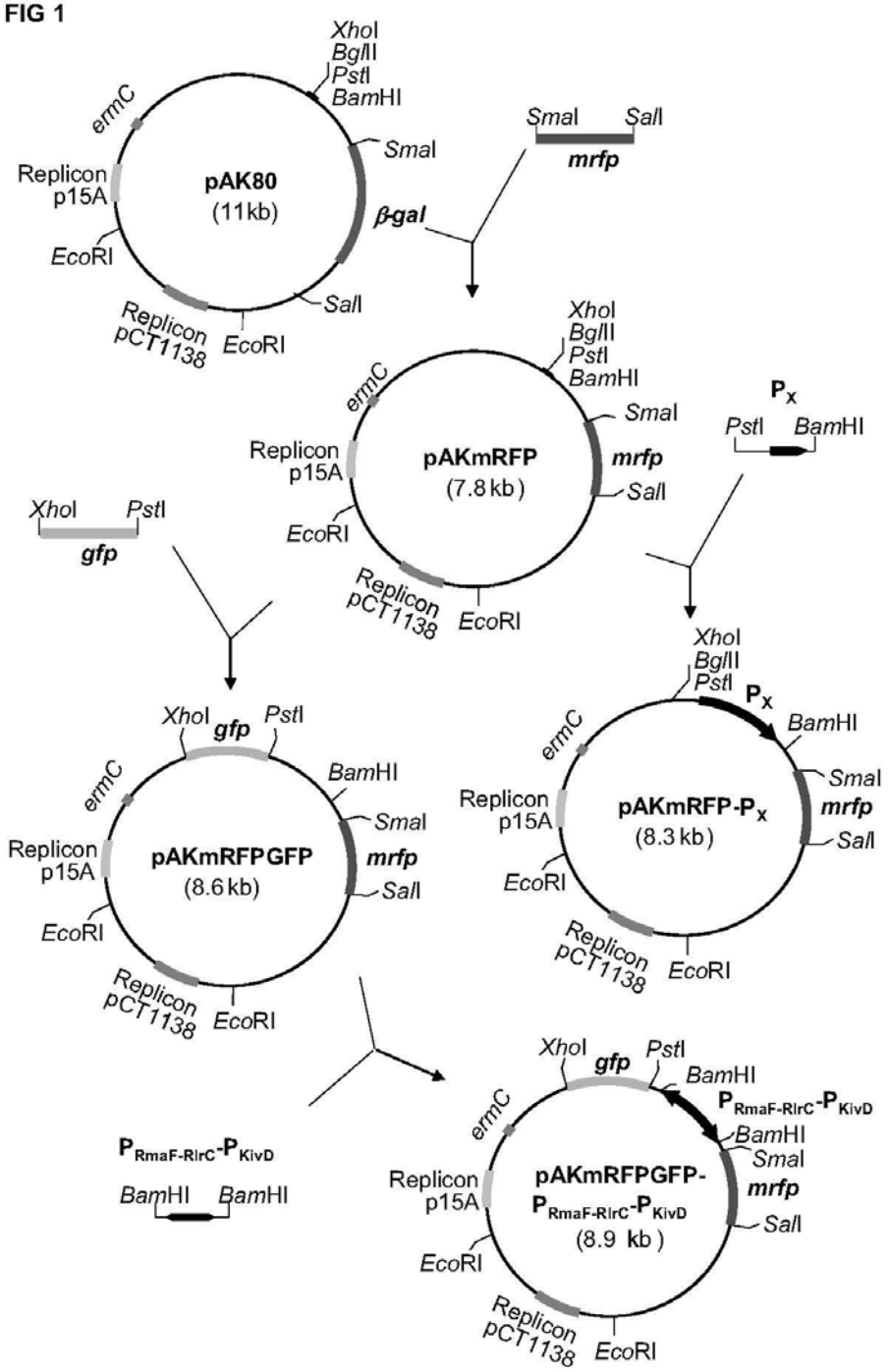

XhoI
BglII
PstI
BamHI
ermC
SmaI
SalI
mrfp
Replicon p15A
pAK80
(11kb)
β-gal
EcoRI
SalI
Replicon pCT1138
EcoRI
XhoI
BglII
PstI
BamHI
ermC
SmaI
Replicon p15A
pAKmRFP
(7.8 kb)
mrfp
SalI
EcoRI
Replicon pCT1138
EcoRI
Px
PstI
BamHI
XhoI
PstI
gfp
XhoI
gfp
PstI
ermC
BamHI
SmaI
Replicon p15A
pAKmRFPGFP
(8.6 kb)
mrfp
SalI
EcoRI
Replicon pCT1138
EcoRI
XhoI
BglII
PstI
Px
ermC
BamHI
SmaI
Replicon p15A
pAKmRFP-Px
(8.3 kb)
mrfp
SalI
EcoRI
Replicon pCT1138
EcoRI
PRmaF-RlrC-PKivD
BamHI
BamHI
XhoI
gfp
PstI
BamHI
PRmaF-RlrC-PKivD
BamHI
SmaI
ermC
Replicon p15A
pAKmRFPGFP-
PRmaF-RlrC-PKivD
(8.9 kb)
mrfp
SalI
EcoRI
Replicon pCT1138
EcoRI

FIG.2A

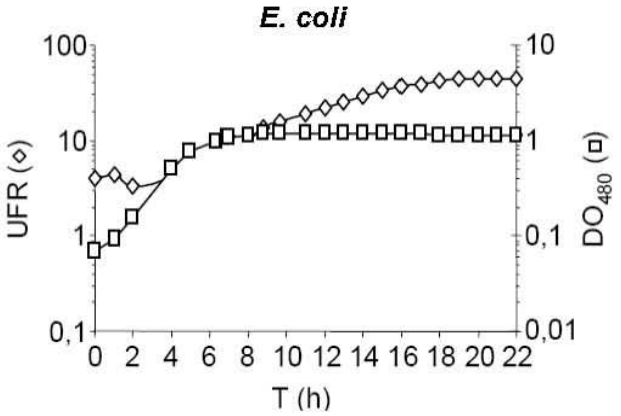


FIG.2B

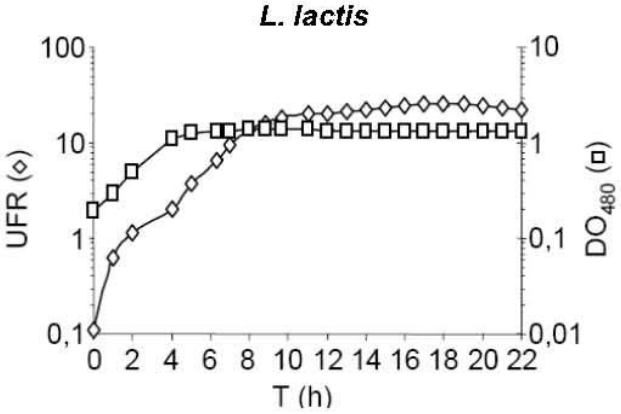


FIG 2C

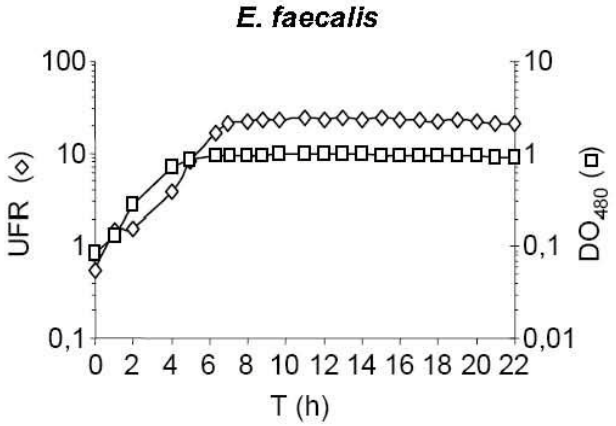


FIG 3

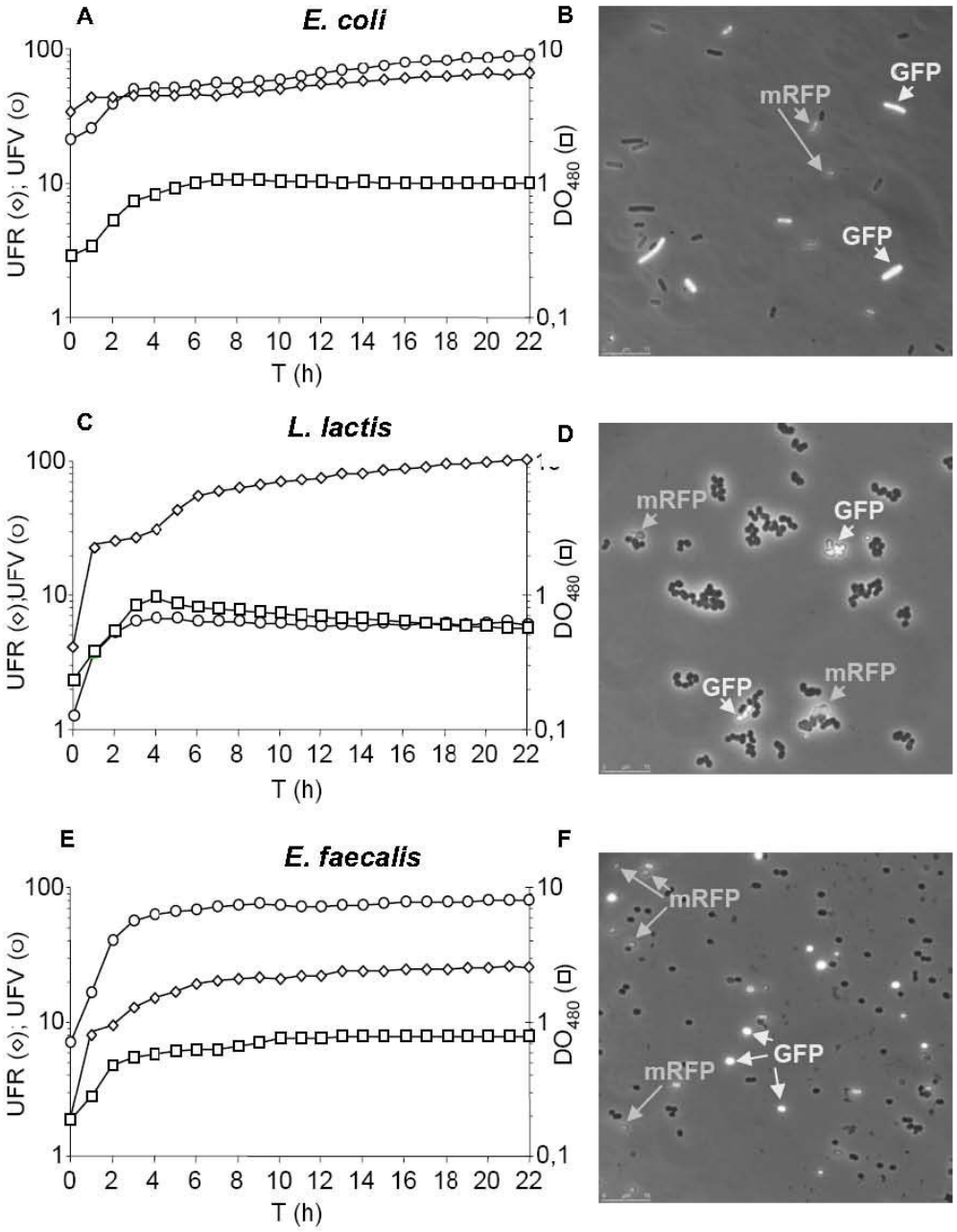


FIG 4 A

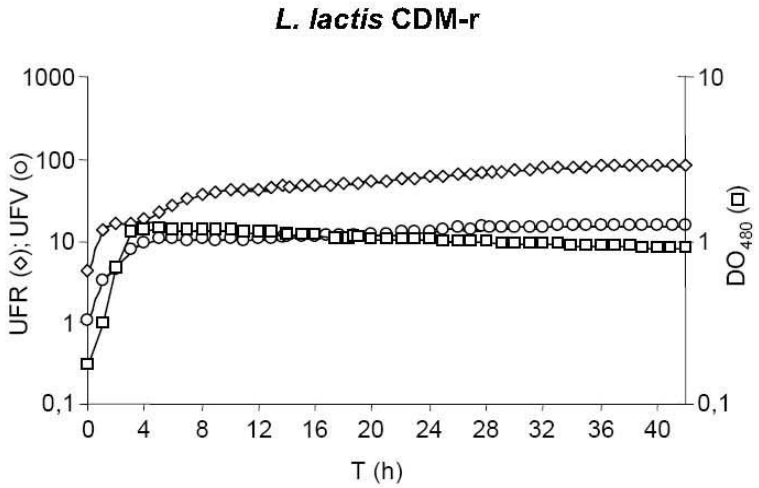

L. lactis CDM-r
1000
100
10
1
0,1
UFR (◇); UFV (○)
10
1
0,1
DO480 (□)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
T (h)

FIG 4 B

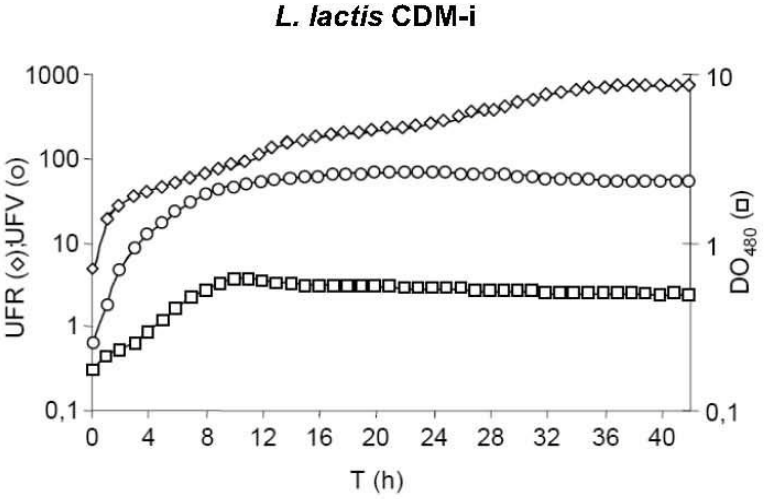

L. lactis CDM-i
1000
100
10
1
0,1
UFR (◇);UFV (○)
10
1
0,1
DO480 (□)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
T (h)

FIG 5 A

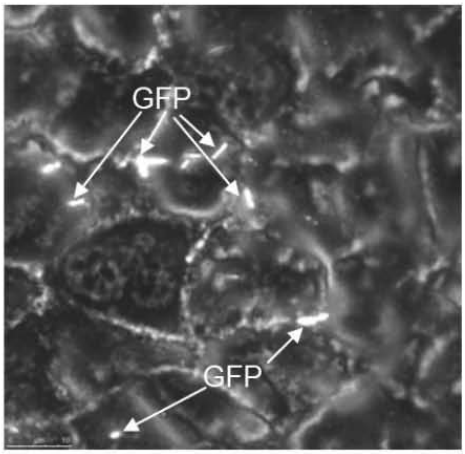


FIG 5 B

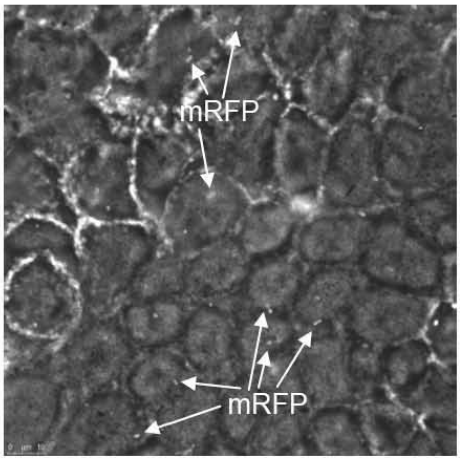
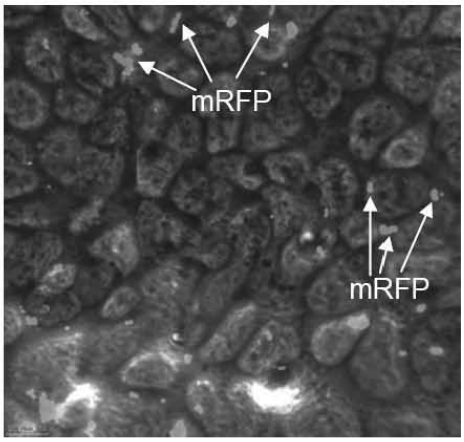


FIG 5 C



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130356

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 15.03.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C07K14/435*** (2006.01)
C12N15/74 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SHANER, N.C. et al., 'Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein', NATURE BIOTECHNOLOGY, 2004, Vol. 22, No. 12, páginas 1567-1572, ISSN: 1087-0156, todo el documento, en particular, Tabla 1, Figura 2.	1-36
Y	FUGLSANG, A., 'Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization', BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2003, Vol. 312, No. 2, páginas 285-291, ISSN: 0006-291X, Resultados, Tabla 1.	1-36
A	MÜLLER-TAUBENBERGER, A. et al., 'Monomeric red fluorescent protein variants used for imaging studies in different species', EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 2006, Vol. 85, Nos. 9-10, páginas 1119-1129, doi: 10.1016/j.ejcb.2006.05.006, todo el documento.	1-36
A	FISCHER, M. et al., 'Visualizing cytoskeleton dynamics in mammalian cells using a humanized variant of monomeric red fluorescent protein', FEBS LETTERS, 2006, Vol. 580, No.10, páginas 2495-2502, ISSN: 0014-5793, todo el documento.	1-36
A	MÜLLER-TAUBENBERGER, A. et al., 'Recent advances using green and red fluorescent protein variants', APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2007, Vol. 77, No. 1, páginas 1-12, ISSN: 0175-7598, todo el documento.	1-36
A	SHANER, N.C. et al., 'Advances in fluorescent protein technology', JOURNAL OF CELL SCIENCE, 2007, Vol. 120, No. 24, páginas 4247-4260, ISSN: 0021-9533, todo el documento.	1-36
A	WO 2009059305 A2 (THE UNIVERSITY OF CHICAGO) 07.05.2009, todo el documento.	1-36

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
31.10.2011	J. L. Vizán Arroyo	1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-36	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-36	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SHANER, N.C. et al., *Nat. Biotechnol*., (2004), 22(12): 1567-72.	2004
D02	FUGLSANG, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun*., (2003), 312(2): 285-91.	2003
D03	MÜLLER-TAUBENBERGER, A. et al., *Eur. J. Cell. Biol*., (2006), 85(9-10): 1119-29.	2006
D04	FISCHER, M. et al., *FEBS Lett.,* (2006), 580(10): 2495-502.	2006
D05	MÜLLER-TAUBENBERGER, A. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol*., (2007), 77(1): 1-12	2007
D06	SHANER, N.C. et al., *J. Cell Sci*., (2007), 120(Pt 24): 4247-60.	2007
D07	WO 2009059305 A2	07.05.2009

En D1 se describen diferentes variantes de la proteína monomérica fluorescente roja (mRFP).
En D2 se analizan los codones más frecuentes en bacterias lácticas (Gram-positias).
En D3-D7 se divulgan diferentes aplicaciones tecnológicas de la proteína mRFP.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 que consiste en una variante de la secuencia del gen *mrfp* codificante de la proteína fluorescente roja (mRFP) (SEQ ID NO: 4). Según la descripción, SEQ ID NO: 1 es una secuencia optimizada del gen codificante de la proteína autofluorescente mCherry (mRFP) para su expresión heteróloga en bacterias Gram-positivas de alto contenido en A+T (c.f. página 5, líneas 17-24). En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D7, no se ha divulgado ninguna secuencia con las mismas características técnicas que la secuencia reivindicada en la solicitud de patente. Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-36 se considera que es nuevo sobre la base de los documentos D1-D7.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-36, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. Reivindicación independiente 1.

2.1.1. Los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D1 se analizan diferentes proteínas fluorescentes monoméricas derivadas de la proteína fluorescente roja DsRed de *Discosoma* sp. En concreto una de las variantes descritas es la proteína fluorescente roja mCherry y su secuencia codificante (cf. D1: Tabla 1, Figura 2). En D2 se describe el uso predominante de codones con alto contenido en A+T en bacterias lácticas (Gram-positivas) y su aplicación en el diseño de sistemas de expresión de secuencias heterólogas en bacterias lácticas como estirpes productoras (cf.D2: Resultados, Tabla 1).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de una nueva secuencia codificante de la proteína monomérica fluorescente roja mRFP.

2.1.3. La solución propuesta es la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 codificante de la variante mCherri de la proteína fluorescente roja mRFP. Según la descripción, la secuencia de la invención SEQ ID NO: 1 ha sido optimizada según el uso predominante de codones de bacterias lácticas (Gram-positivas) (c.f. página 5, líneas 17-24). Esta característica técnica es la diferencia básica de SEQ ID NO: 1 con respecto a la secuencia divulgada en D1 (cf. D1: Figura 2). En el estado de la técnica se ha divulgado la lista de codones de uso más frecuente en bacterias lácticas y su aplicación en el diseño de sistemas de expresión de genes heterólogos en dichos microorganismos (cf. D2: Resultados, Tabla 2). Por otro lado, se han divulgado secuencias codificantes de mRFP optimizadas de acuerdo al uso predomínate de codones de diferentes especies para su expresión en las correspondientes especies (c.f. D3). Por consiguiente, se considera que, sobre la base de los documentos D1 y D2, la solución propuesta por la solicitud de patente al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por ello, el objeto de las reivindicación independiente 1 puede considerarse que no es inventivo. Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2-36 también se considera que no es inventivo.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-36 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.